

ENRIQUECIMENTO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E AMPA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA

E. F. Fay, R. B. Abakerli

Embrapa Meio Ambiente- Caixa Postal 69- Jaguariúna, SP, Brasil, CEP 13820-000

e-mail: bethfay@cnpma.embrapa.br

RESUMO

O glifosato é um dos agrotóxicos mais utilizados mundialmente. Tanto o glifosato como o AMPA são solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos. Este trabalho validou a determinação de glifosato e AMPA, utilizando pré-concentração para permitir a extração destes dois compostos de matrizes aquosas ambientais no nível de partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$). Os dois compostos, glifosato e AMPA, podem ser isolados da água por complexação em resina quelante na forma férrica (Chelex Fe III), seguida de eluição dos compostos com ácido clorídrico e eliminação do ferro em resina de troca aniônica.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por troca catiônica, utilizando cromatógrafo equipado com sistema de reação pós-coluna com OPA (o-ftalaldialdeído)/ MERC (mercaptoetanol) e detector de fluorescência mostrou ser bastante eficiente.

Foram estabelecidos para o sistema analítico os limites de detecção, a linearidade de resposta para a faixa de concentração de interesse, como também foram estabelecidos os limites de quantificação e testes de recuperações analíticas. Esses resultados indicam que o método preenche os critérios de aceitabilidade para determinação de resíduos de glifosato e AMPA na matriz aquosa. A validação para água foi efetuada no intervalo de concentração de 1 a $80\mu\text{g L}^{-1}$. Para 500ml de água a sensibilidade do método foi de $1\mu\text{g L}^{-1}$. A recuperação média de glifosato e AMPA em água na faixa de $1-80\mu\text{g L}^{-1}$, foi de $74,0\pm 4,5$ e de $67,0\pm 6,6$ respectivamente.

INTRODUÇÃO

O glifosato é um herbicida não seletivo e de pós-emergência, muito utilizado na agricultura para o controle de ervas daninhas anuais e perenes. Este uso amplo é justificado pela baixa toxicidade para mamíferos, embora atualmente haja descrição de efeitos secundários afetando as funções reprodutivas em animais (Cicalo et al., 1996). A efetividade do glifosato como herbicida é parcialmente devida a sua natureza química: alta solubilidade em água ($11,6\text{g L}^{-1}$ a 25°C e estável a hidrólise em pH 3; 6 e 9 ($5-35^\circ\text{C}$)); insolubilidade em solventes orgânicos; comportamento complexo e similar aos amino ácidos e amino açúcares naturais (Cicalo et al., 1996), portanto apresentando alta polaridade. No solo e água é rapidamente degradado tendo como resultado a produção do metabólito ácido amino metilfosfônico (AMPA). O glifosato sofre fotodegradação na água em condições naturais (Tomlim, 2000). Entretanto, são estas propriedades que também tornam a análise de glifosato, e do metabólito AMPA, bastante difíceis quando presentes em níveis residuais em uma variedade de matrizes ambientais.

A derivatização com o-ftalaldeído (OPA) após separação em coluna de troca catiônica foi proposta por Moye et al., (1983) e modificações deste método foram apresentadas. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) filtra as amostras de água e injeta diretamente no cromatógrafo, fazendo posterior derivatização com OPA/MERC. A desvantagem deste método é a falta de um processo de extração, pois teores elevados de sais podem danificar a coluna de troca catiônica, sendo o limite de detecção do método de 6 a $9\mu\text{g L}^{-1}$ (Mallat & Barceló, 1998).

Neste trabalho propomos a determinação de glifosato e AMPA em águas naturais pelo uso de uma etapa de pré-concentração em coluna de complexação que permite a separação de sais bem como o enriquecimento dos compostos, atingindo níveis de partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Água destilada e amostras de água de 3 rios, próximos a áreas agrícolas com uso conhecido de glifosato, foram coletadas e utilizadas ao longo deste trabalho. Todas as amostras recebidas para o monitoramento dos resíduos foram conservadas em freezer a -20°C até o momento da análise.

2. Equipamentos e condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido marca Shimadzu com amostrador automático, SIL-10 A; bomba para HPLC, LC-10AD; forno para coluna cromatográfica, CTO-10A; bombas para reação pós-coluna, Eldex; forno para reação pós-coluna; detector de fluorescência, RF-535; processador Class- LC 10. Coluna para HPLC: Aminex A-9, forma potássica, $300 \times 4,6 \text{ mm d.i.}$ e $150 \times 4,6 \text{ mm d.i.}$, Bio Rad Laboratories. Ao sistema estava acoplada uma válvula de 6 vias desviadora de fluxo, Valco. Tubos de aço em espirais para reação (solução oxidante $3,0\text{m}$ de comp. $\times 0,02''$ d.i. $\times 1/16''$ d.e.; solução de OPA/MERC, $3,0\text{m}$ comp. $\times 0,02''$ d.i. $\times 1/16''$ d.e.).

Temperatura das colunas: 50°C ; temperatura da espiral de reação com oxidante: 38°C ; fluxo da fase móvel: $0,5\text{mL min}^{-1}$; fluxo da solução oxidante: $0,2\text{mL min}^{-1}$; fluxo da solução de OPA: $0,4\text{mL min}^{-1}$; volume injetado: $100\mu\text{L}$; detector: comprimento de onda de excitação: 350nm ; comprimento de onda de emissão: 440nm .

3. Reagentes

Padrões analíticos de glifosato e AMPA, pureza 99,9%, cedidos pela Monsanto do Brasil. Resina Chelex®-100, 100-200mesh forma sódica; resina AG1- X8, 200-400mesh, forma cloreto, lavada três vezes com água deionizada; ácido clorídrico concentrado; ácido fosfórico 85%; cloreto de sódio; hidróxido de potássio; hidróxido de sódio e ácido bórico foram grau analítico; cloreto férrico hexahidratado; 2-mercaptoetanol; 1,2- dicarboxaldeído ftálico foram grau reagente; clorofórmio, grau resíduos; dihidrogênio fosfato de potássio 99,99%, e metanol grau HPLC; hipoclorito de

cálcio com 65% de cloro disponível; água deionizada e soluções de ácido clorídrico 6N, 0,2N, 0,1N e 0,02N.

Soluções padrão de glifosato e AMPA, para cromatografia e para as fortificações, foram preparadas em água deionizada a partir de diluições de uma solução estoque de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram pesadas diretamente em frascos de boca larga, de 20mL, 0,0100g de glifosato e 0,0100g de AMPA e adicionados 10mL de água deionizada com ajuda de uma pipeta volumétrica.

Resina Chelex® na forma férrica: 500g da resina Chelex®-100, forma sódica, suspensa em 1L de água deionizada, sendo então adicionados 25mL de ácido clorídrico 6N e 500mL de solução de cloreto férrico 0,1N. Após agitação e sedimentação da resina a fase aquosa foi decantada. Esta operação foi repetida por mais duas vezes e a resina foi lavada com água deionizada e armazenada em frasco âmbar.

Fase móvel para HPLC: 0,005M de dihidrogênio fosfato de potássio, 4,0% de metanol em água deionizada, pH 2,1, ajustado com ácido fosfórico concentrado.

Solução oxidante de hipoclorito de cálcio: Foram pesados 1,36g de dihidrogênio fosfato de potássio, 11,6g de cloreto de sódio e 0,4g de hidróxido de sódio e dissolvidos em 500mL de água deionizada. A essa solução foram adicionadas 20,0mg de hipoclorito de cálcio dissolvido em 50mL de água deionizada. O volume foi acertado para 1,0L com água deionizada e a solução filtrada por membrana de nylon de $0,45\mu\text{m}$.

Solução de OPA/MERC: Foi preparado 1L de uma solução de ácido bórico 0,4M e o pH ajustado para $10,40 \pm 0,02$ usando solução de hidróxido de potássio 45%. A solução foi filtrada em membrana de $0,45\mu\text{m}$ e cerca de 700mL dessa solução foram transferidos para um frasco volumétrico de 1L. A esta foi adicionada uma solução de 800,0mg de 1,2-dicarboxaldeído ftálico dissolvido em 10mL de metanol e 2mL de 2-mercaptopetanol, o volume do balão foi completado com ácido bórico 0,4M.

4. Procedimento

500mL de amostra de água, pH acertado para 4,0, com solução de hidróxido de sódio 1N foram aplicados em colunas de vidro contendo 15ml de resina Chelex®-Fe(III). As amostras foram eluídas a um fluxo de 6mL min^{-1} e as colunas lavadas com 100,0mL de HCl 0,2N. O glifosato e o AMPA foram então eluídos com alíquotas de 3,0mL e 4,0mL de HCl 6N, e os volumes de eluição foram, até este ponto, todos descartados. Os eluatos subsequentes de três porções de 5,0mL de HCl 6N foram recolhidos e adicionados de 10,0mL de HCl concentrado. Os extratos homogeneizados foram aplicados em 8cm de resina AG1-X8, contida numa coluna de 1cm d.i. x 32cm de comprimento, previamente lavada com três porções de 5,0mL de HCl 6N. Os extratos foram recolhidos em balões de 125,0mL e a coluna foi lavada com porções extra de 2,0mL e de 8,0mL de HCl 6N. As amostras foram concentradas à secura sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura de 60°C e o resíduo dissolvido em 5,0mL de fase móvel. Após filtração por membrana de $0,45\mu\text{m}$, as amostras foram analisadas por HPLC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em função das características químicas do glifosato e AMPA foi testada a possibilidade de sua análise em água envolvendo a concentração a vácuo das amostras, em presença de K_2HPO_4 (Miles et al., 1986). Este método direto de análise foi aplicado para um nível de concentração de $100\mu g L^{-1}$. Nas condições testadas (Tabela 1) foram obtidas recuperações muito boas para o glifosato, (Rio 1: 93%, Rio 2: 91% e Rio 3: 88%), equivalentes aos valores obtidos com água destilada. Porém foram observados problemas analíticos com a determinação cromatográfica do AMPA que não foi recuperado nas águas ambientais.

Tabela 1. Resultados da comparação dos métodos na recuperação de glifosato e AMPA de amostras de água ($80\mu g L^{-1}$).

Amostra de água	Método direto (%)		Complexação (%)	
	glifosato	AMPA	glifosato	AMPA
Destilada pH 7	88	82*	71	60
Destilada pH 11	91	90*	72	65
Destilada com K_2HPO_4 pH 7	96	96*	-	-
Destilada com K_2HPO_4 pH 11	92	102*	-	-
Amostra ambiental				
Rio 1	93	NR*	76	74
Rio 2	91	NR*	72	67
Rio 3	88	NR*	84	73

*distorção de resposta; NR não recuperado

Em um experimento controle utilizando padrão foi variada a concentração de K_2HPO_4 de 0 até 0,02M, observando-se que até a concentração de 0,005M de K_2HPO_4 não houve problemas de distorção de resposta na determinação do AMPA (Figura 1).

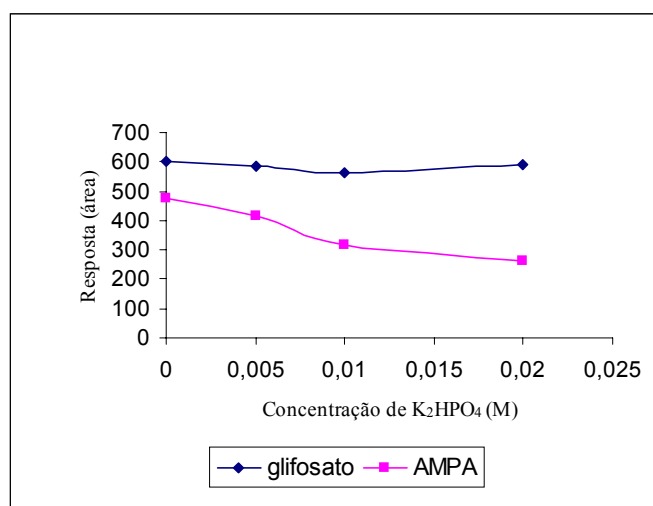


Figura 1. Distorção da resposta de AMPA com o aumento da molaridade de K_2HPO_4

Provavelmente a falta de recuperação de AMPA, nas amostras ambientais quando utilizado o método direto, pode ser devida a presença de excesso de sais nas águas

amostradas. A região em que foram coletadas estas amostras apresenta normalmente elevado teor de sais nas águas. Em função disto foi utilizada a resina de complexação Chelex-100.

O método de complexação, para essa mesma faixa de concentração, forneceu recuperações menores, porém ainda dentro de limites aceitáveis (Tabela 1).

Não existe, para o glifosato, um valor de tolerância para qualidade de água. Com isto procurou-se atingir o limite de quantificação de $1-10\mu\text{g L}^{-1}$. e a detecção dos compostos neste nível requer que se utilize grande quantidade de amostra. Desse modo optou-se por determinar glifosato e AMPA por enriquecimento em resina de complexação para o monitoramento de águas ambientais (Tabela 2).

Tabela 2. Recuperação de glifosato e AMPA de amostras de água ambiental por complexação em resina Chelex-100.

Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação de glifosato (%)	Recuperação de AMPA (%)
80	$74\pm 4,9$	$67\pm 8,7$
10	$76\pm 4,5$	$67\pm 5,9$
5	$74\pm 5,3$	$63\pm 6,5$
1	76	65

Média de duas a oito determinações

A estabilidade dos compostos foi testada fortificando com glifosato e AMPA, amostra de água de rio e, armazenando em geladeira a 10°C , durante três meses. Após esse tempo a amostra foi analisada não sendo observada perda de glifosato ou AMPA. As recuperações dos compostos, glifosato (80%) e AMPA (77%), foram equivalentes às recuperações obtidas com amostras recém fortificadas. Este controle permitiu saber quanto tempo podemos manter as amostras estocadas durante um projeto de monitoramento de águas ambientais.

O método foi utilizado no monitoramento de água de rios coletadas nos meses de março, abril, maio, junho e julho. Estas amostras foram analisadas e não apresentaram resíduos de glifosato ou AMPA até o limite de $1\mu\text{g L}^{-1}$, com exceção de uma onde foi detectado glifosato ($16\mu\text{g L}^{-1}$).

A Figura 2 mostra o cromatograma de 5 amostras de rio comparadas à amostra fortificada em $10\mu\text{g L}^{-1}$ e ao padrão de $0,75\mu\text{g mL}^{-1}$. Isto demonstra a alta sensibilidade alcançada com o enriquecimento das amostras.

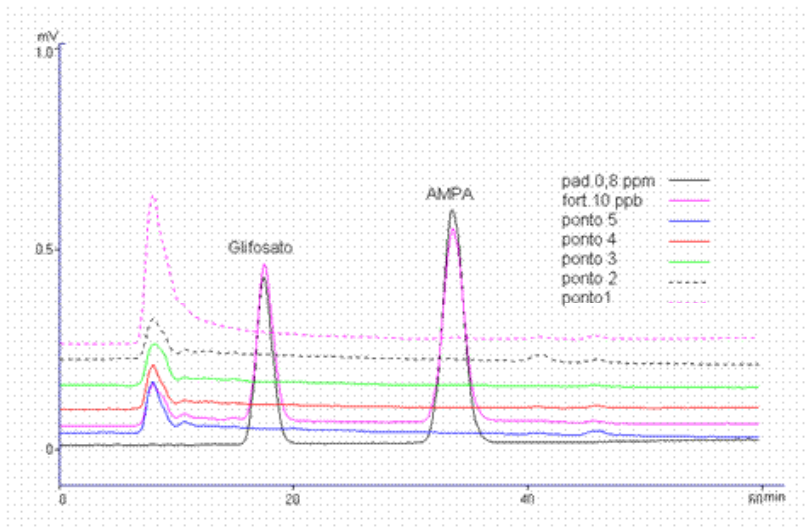


Figura 2. Cromatogramas de amostra de água de rio.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MILES, C. J.; WALLACE, L.R.; MOYE, H. A. Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 69, p. 458-461, 1986.
2. CICALO, M. G.; GOODALL, D. M.; MATTHEWS, W. Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A*, v. 745, p. 189-200. 1996.
3. MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 823, p. 129-136. 1998.
4. MOYE, H. A.; MILES, C. J.; SCHERE, S.J. A simplified high-performance liquid chromatographic residue procedure for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in fruits and vegetables employing postcolumn fluorogenic labeling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 31, p. 69-72, 1983.
5. TOMLIN, C.D.S. (ED.). *The pesticide manual*. 12. ed. Farnham: The British Crop Protection Council, 2000. p. 407.